

MITOCHONDRIA JAKO INTEGRATORY APOPTOZY*

MITOCHONDRIA - AN APOPTOSIS INTEGRATORS

Anna M. CZARNECKA^{1,2}, Paweł GOLIK^{1,3}, Ewa BARTNIK^{1,3}

¹Zakład Genetyki, Uniwersytet Warszawski, ²Studium Medycyny Molekularnej,
³Instytut Biochemii i Biofizyki PAN

Streszczenie: Nadliczbowe, stare lub uszkodzone komórki organizmów wielokomórkowych podlegają eliminacji w drodze apoptozy, czyli programowanej śmierci komórki. Apoptoza zachodzi w wyniku typowych przemian morfologicznych i biochemicznych. Aktywowana jest kaskada proteaz cysteinyowych – kaspaz, które tną docelowe białka. Dochodzi także do aktywacji nukleaz, co razem prowadzi do degradacji białek i DNA komórki w ciągu kilku godzin. Mitochondria są organellami, w których następuje integracja sygnałów apoptotycznych z różnych szlaków, aktywowanych m.in. przez niedotlenienie, szok cieplny, czy usunięcie czynników wzrostowych. Odgrywają one podstawową rolę w koordynacji i amplifikacji sygnału do autodegradacji komórki. Regulują apoptozę m.in. poprzez zatrzymanie czynników pro- i antyapoptotycznych. Zaburzenie aktywacji i/lub przebiegu apoptozy jest jedną z głównych cech komórek nowotworowych.

Słowa kluczowe: mitochondria, apoptoza, nowotwór, p53, mortalina, białko szoku cieplnego.

Abstract: Supernumerary, old or damaged cells of multicellular organisms are eliminated by apoptosis – programmed cell death. Apoptosis is accompanied by series of characteristic morphological and biochemical events. The cell activates a cascade of cysteine proteases – caspases, that digest target proteins. Nucleases are also activated, which together leads to irreversible cell damage within few hours. Mitochondria are the cell compartment that integrates signals from different apoptotic pathways activated by ischemia, heat shock or growth hormones depletion. Mitochondria play the primary role in coordination and amplification of cell autodegradation signals. They regulate apoptosis by sequestration of pro- and antiapoptotic proteins. Perturbation of activation or execution of apoptosis is characteristic feature of cancer cells.

Key words: mitochondria, apoptosis, cancer, p53, mortalin, heat shock protein.

*Manuskrypt został sfinansowany z grantu MEIN 2P04A00229.

WSTĘP

Apoptoza, czyli programowana śmierć komórki (ang. *programmed cell death*, PCD) to proces, dzięki któremu nadliczbowe, stare lub uszkodzone komórki są eliminowane z organizmu. Stanowi ona kluczowy element homeostazy tkanki i prawidłowego rozwoju organizmu [1,2,3]. W obrazie morfologii komórki w czasie apoptozy obserwuje się obkurczanie cytoplazmy, skupianie chromatyny w zbite masy pod otoczką jądrową i rozpad jądra na mniejsze fragmenty (tzw. karioreksja), a także gęstnienie cytozolu. W końcowej fazie komórka rozpada się na szereg obłonionych, kulistych fragmentów zwanych ciałkami apoptotycznymi. Ciałka te są szybko fagocytowane przez makrofagi i sąsiadujące komórki [4,5,6].

Apoptoza podlega ścisłej kontroli. Jest regulowana na wielu poziomach. Istnieje możliwość zahamowania apoptozy nawet po zapoczątkowaniu działania kaskady kaspaz efektorowych [7,8,9]. Znaczącą rolę w hamowaniu apoptozy odgrywają m.in. mitochondria [2].

Zaburzenie mechanizmów regulujących apoptozę może prowadzić do niekontrolowanego rozplemu tak zmienionych komórek. Nadliczbowe komórki, które nie są eliminowane, rywalizują z sąsiadami o przestrzeń i składniki odżywcze. W przypadku organizmu wielokomórkowego, jakim jest człowiek, mówimy, iż powstaje nowotwór [10]. Nowotwór (ang. *neoplasm*) to masa komórek powstała z komórek prawidłowych w wyniku procesów patologicznych tzw. transformacji. Czynnikiem sprawczym transformacji są zaburzenia genetyczne i epigenetyczne [11].

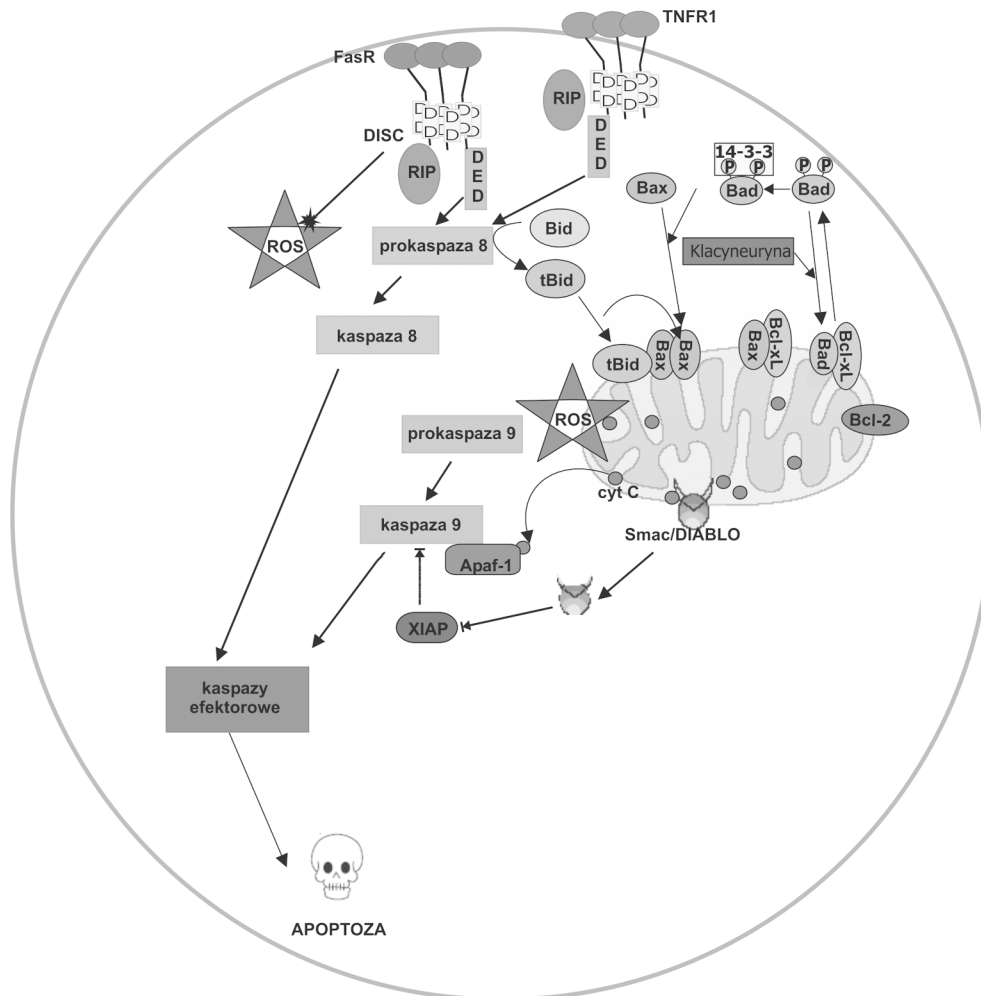
PRZEBIEG APOPTOZY

Apoptoza przebiega dwoma głównymi ścieżkami: wewnątrzpochodną (mitochondrialną) lub zewnątrzpochodną (receptorową). Bezpośrednim czynnikiem odpowiedzialnym za degradację komórki jest aktywacja kaspaz. Kaspazy to rodzina proteaz cysteinyowych tnących substrat po rozpoznaniu odpowiedniego motywu w białku, np. motyw GELE dla kaspazy-7 [12]. Cięcie przez wszystkie kaspazy następuje po kwasie asparaginowym. Kaspazy są syntetyzowane jako zymogeny (pro-kaspazy) z N-końcową prekursorową oraz C-terminalną końcową domeną katalityczną zbudowaną z dwóch peptydów o masie ok. 20 kDa (p20) oraz ok. 10 kDa (p10). Kaspazy możemy podzielić na aktywatorowe (sygnałowe, górne; ang. *upstream, apical, signaling caspases*), do których zaliczamy kaspazy 2, 8, 9, 10, i 12 oraz efektorowe (ang. *downstream, effector, executioner*), do których zaliczamy kaspazy 3, 6, i 7. Kaspazy aktywatorowe są funkcjonalne jako dimery, natomiast efektorowe, które występują w cytozolu jako preformowane dimery, są aktywowane poprzez cięcie proteolityczne przez kaspazy aktywatorowe. Aktywne kaspazy efektorowe tną białka docelowe [13].

Ścieżka zewnątrzpochodna apoptozy jest uruchamiana w odpowiedzi na brak czynników wzrostowych, brak substancji odżywczych, po napromieniowaniu lub pod wpływem substancji chemicznych (np. leków, ceramidów, neurotoksyn, disialogangliozydów, substancji toksycznych, cytostatyków) i czynników fizycznych (różne rodzaje promieniowania, wysoka temperatura). Ścieżkę zewnątrzpochodną wyzwalają także hormony, cytokiny (m.in. FasL, TNF, Apo3L, Apo2L), wirusy, wolne rodniki (ROS). Czynniki te pobudzają receptory rodziny TNF-R (Fas/APO-1/CD95, TNFR1, DR-3, DR-4/TRAIL-R1, DR5/TRAIL-R2), które przekazują sygnał do kaspazy-8 [1,3,14,15,16]. Z kolei ścieżkę wewnątrzpochodną wyzwalają zmiany integralności błon mitochondrialnych, fluktuacje wartości potencjału błonowego mitochondriów czy wzrost produkcji wolnych rodników. Ścieżkę wewnątrzpochodną aktywują też stres oksydacyjny, uszkodzenia DNA i nagromadzenie źle sfałdowanych białek [3,13]. Rolę receptorów uszkodzeń pełni białko z domenami BH-3, co w konsekwencji prowadzi do uczynnienia kaspazy 9 [1,3,14,15,16].

Ścieżka zewnątrzpochodna uruchamiana jest, gdy do receptora śmierci (ang. *death receptor*) przyłączany jest ligand. Wywołuje to aktywację szlaku sygnałowego, co w efekcie prowadzi do degradacji komórki. Pierwszym opisanym modelem apoptozy indukowanej połączeniem liganda z receptorem śmierci jest układ receptora z rodziny TNF. Opisano receptor-1 TNFR1 oraz Fas (CD95, Apo-1), gdzie poprzez domenę śmierci (ang. *death domain*, DD) białko FADD (ang. *Fas-associated death domain*) aktywuje kaspazę-8 [3]. Dziś wiemy, że receptory śmierci należą do dużej rodziny białek spokrewnionych z receptorem TNF (ang. *TNF receptor-related members*), obejmującej receptory TNFR1 (ang. *tumour necrosis factor receptor-1*), Fas i receptor śmierci-5 (DR5, TRAILR2). Receptory te są aktywne jako trimery. Trimeryzacja zachodzi po związaniu liganda (odpowiednio TNF, FasL i TRAIL). Związanie liganda Fas (FasL) z receptorem Fas prowadzi do zmiany konformacyjnej receptora, co powoduje z kolei przyłączenie białka adaptorowego FADD do domeny cytoplazmatycznej receptora Fas. Białko FADD z kolei łączy się z pro-kaspazą-8 poprzez domeny efektorowe śmierci (ang. *Death Effector Domains*, DED). Dochodzi do włączenia prokaspazy-8 w DISC (ang. *Death-Inducing Signaling Complex*), co prowadzi do jej aktywacji [13]. Przekazywanie sygnału przez szlak TNFR1 wymaga związania białka RIP do kompleksu receptorowego poprzez domenę TRADD (ang. *TNFR-associated death domain*) [3]. W przebiegu ścieżki wewnątrzpochodnej uczestniczą mitochondria oraz białka uwalniane z mitochondriów (patrz ryc. 1) [3,13].

Ścieżka wewnątrzpochodna charakteryzuje się wzrostem przepuszczalności zewnętrznej błony mitochondrialnej (ang. *mitochondrial outer membrane permeabilization MOMP*), uwolnieniem cytochromu *c* z przestrzeni międzybłonowej mitochondrium (ang. *mitochondrial intermembrane space*, IMS), utworzeniem apoptosomu i aktywacją kaspaz [3,13]. Wiele typów cząsteczek uwolnionych przez mitochondria wpływa na aktywację apoptozy są to m.in. cytochrom *c*, wolne rodniki (ROS) i Ca^{2+} oraz czynnik inicjujący apoptozę (ang. *apoptosis inducing factor* – AIF), [3]. Tak jak w ścieżce zewnątrzpochodnej główną rolę odgrywała kaspaza 8, tak w ścieżce wewnątrzpochodnej jest to kaspaza 9, która aktywuje kaspazy efektorowe [4,17,18].



RYCINA 1. Udział mitochondriów w apoptozie. Pokazano ścieżkę apoptozy zewnątrzpochodną zależną od receptorów śmierci FasR (*receptor death domains* – DD; *the death effector domains* DED) oraz wewnątrzpochodną indukowaną przez translokację Bax lub Bad (pro-apoptotycznych białek rodziny Bcl-2) do mitochondrium. Bad jest fosforylowane (P) w odpowiedzi na czynniki wzrostowe, w apoptozie Bad jest defosforylowane przez kalcyneurynę i przemieszczane do mitochondrium, gdzie wiąże Bcl-xL tworząc PTP (*permeability transition pore*). Kaspaza 8 niszczy białko Bid, którego C-terminalny fragment (tBid) przemieszcza się do mitochondrium, aktywuje Bax i pobudza uwolnienie cytochromu *c* (cyt *c*). W cytozolu, cyt *c* aktywuje kaspazę 9 przez wiązanie z Apaf-1 i dATP

Ostatnio udowodniono, iż organelum komórkowym zaangażowanym w proces apoptozy są także lizosomy. W błonie lizosomów, analogicznie jak w błonie zewnętrznej mitochondrium powstają kanały (LMP – *lysosomal-membrane permeabilization*) przepuszczające substancje zgromadzone w lizosomach. Do cytoplazmy uwalniane są więc katepsyny oraz inne hydrolazy i duża ilość protonów (H^+). Dochodzi do zakwaszenia środowiska komórki, co wtórnie aktywuje mitochondrialną ścieżkę

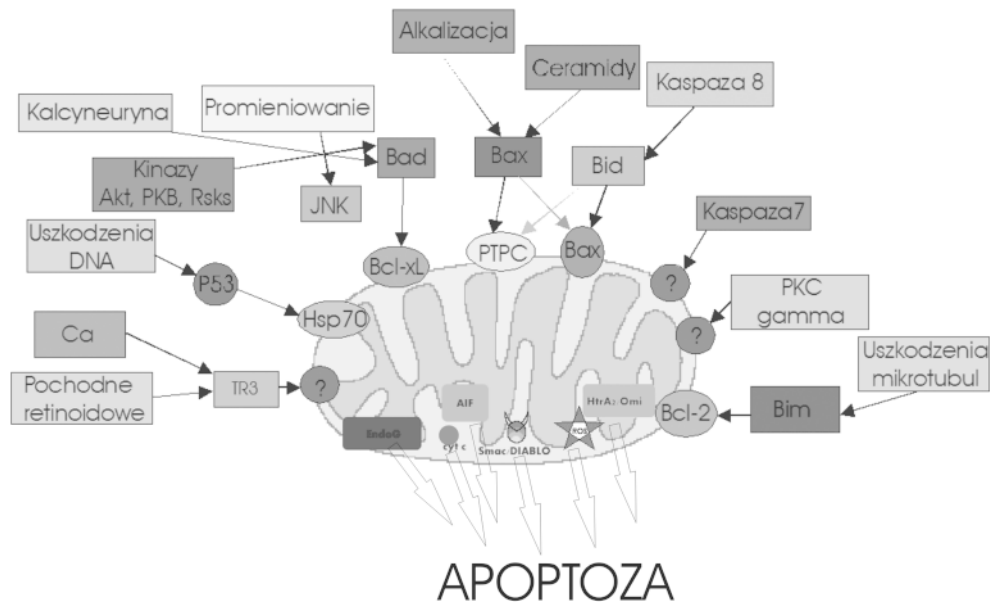
apoptozy i sprzyja powstawaniu MOMP. LMP może być indukowane przez klasyczne induktory apoptozy, przekaźniki II rzędu czy toksyny. Do powstania LMP dochodzi zatem pod wpływem aktywacji receptorów śmierci (przekazywanie sygnału do lizosomu przez białka FAN i RIP), receptorów sigma-2, uszkodzeń DNA (p53), stresu oksydacyjnego (PLA2), staurosporyny, wzrostu stężenia jonów wapnia w komórce, czy działania sfingozyny [19].

MITOCHONDRIA SĄ INTEGRATORAMI APOPTOZY

Silne przesłanki wskazujące na rolę mitochondriów w apoptozie pojawiły się, gdy grupa Newmeyera [20] udowodniła nieodzowność mitochondriów w ekstrakcie komórkowym indukującym zmiany charakterystyczne dla apoptozy w jądrach komórkowych izolowanych z komórek *Xenopus*. Kolejne prace pokazały, że to cytochrom *c* uwalniany z mitochondriów był konieczny dla aktywacji kaspaz [11]. W kolejnych latach zidentyfikowano całą grupę białek biorących udział w programowanej śmierci komórki. Wyodrębniono czynnik inicjujący apoptozę AIF (ang. *apoptosis inducing factor*), czynnik aktywujący kaspazy Apaf-1 (ang. *apoptosis protease activating factor*), a także liczną rodzinę białek pro- i anty-apoptotycznych Bcl-2 (ang. *B-cell lymphoma protein 2*) i w końcu opisano również kolejność aktywacji kaspaz [16,21].

Mitochondria są miejscem działania białek rodziny Bcl-2/Bcl-X_L, do której należą zarówno białka pro-, jak i antyapoptotyczne. Do probiałek stymulujących programowaną śmierć komórki należą Bax (ang. *Bcl-2-associated X protein*), Bak (ang. *Bcl-2-antagonist/killer*), Bad (ang. *Bcl-2-antagonist of cell death*), Bid (ang. *BH3 [B cell leukemia/lymphoma-2 {Bcl-2} homology domain 3] interacting domain death agonist*), Bim (ang. *Bcl-2 interacting mediator of cell death*), Bmf (ang. *Bcl-2 modifying factor*), Noxa, Puma (ang. *p53 upregulated modulator of apoptosis*), BNip3 (ang. *Bcl-2/adenovirus E1B nineteen kDa-interacting protein 3*), i Nix (*Nip3-like protein X*)/BNip3L (ang. *BNip3-like protein*). Z kolei do białek antyapoptotycznych należą białka Bcl-2 i Bcl-X_L (*Bcl-x protein long isoform*) [13,22,23,24,25]. W błonie zewnętrznej mitochondrium zakotwiczone jest białko Bcl-2, a białka Bid, Bax, Bad, Bim łączą się z błoną w czasie apoptozy. Dokładna funkcja proapoptotycznych białek nie jest jeszcze wystarczająco poznana. Wiadomo, iż białko Bax, należące do pierwszej grupy, tworzy w błonach mitochondrialnych kanały, przez które cytochrom *c* wypływa do cytoplazmy, czemu przeciwdziałają Bcl-2, Bcl-X_L. Natomiast białko Bim najprawdopodobniej promuje uwalnianie cyt *c* i EndoG i przyspiesza apoptozę. Z kolei funkcją antyapoptotycznych białek Bcl-2 i Bcl-X_L jest wiązanie czynnika Apaf-1, co uniemożliwia jego oddziaływanie z prokaspazą 9. Białka rodziny Bcl-2/Bcl-X_L funkcjonują zatem jako system przełącznikowy uwalniania cyt *c* [4,6,14].

Ponadto mitochondria są organellami, w których następuje integracja sygnałów apoptotycznych z różnych szlaków (patrz ryc. 2). Klasyczny opis apoptozy przedstawia dwie możliwości aktywacji apoptozy – zewnątrzpochodną oraz wewnątrzpochodną



RYCINA 2. Integracja sygnałów proapoptotycznych w mitochondrium. Uszkodzenia mikrotubul, kinaza białkowa C typu gamma (PKC gamma), kaspaza 8, kaspaza 7, ceramidy, alkalizacja, promieniowanie, kinazy Akt (kinaza białkowa B), Rsk (rybosomalna kinaza S6), uszkodzenia DNA, jony wapnia (Ca^{2+}) i pochodne retinoidów oddziałują na białka z rodziny Bcl-2. Integracja sygnałów proapoptotycznych w mitochondrium prowadzi do uwolnienia białek z przestrzeni mitochondrialnej (cyt c, EndoG, Smac/DIABLO, HtrA2/Omi, AIF). Białka te, wraz z wolnymi rodnikami tlenowymi (ROS) aktywują apoptozę

(patrz. wyżej). Niezależnie od tego, jaki czynnik wywołuje apoptozę, mitochondria odgrywają podstawową rolę w koordynacji i amplifikacji sygnału auto-degradacji komórki [4,17]. W większości komórek kaspaza 8 jest aktywowana poprzez szlak kaspazy 9, a aktywność kaspazy 8 prowadzi do wyrzutu cytochromu c z mitochondriów. Kaspaza 8 najczęściej aktywuje pro-kaspazę 3 i białko Bid (ang. *BH3* [*B cell leukemia/lymphoma-2* {*Bcl-2*} *homology domain 3*] *interacting domain death agonist*), proapoptotyczne białko z rodziny Bcl-2, co łączy szlak wewnątrz- i zewnątrzpochodny [3,13,18]. Pokazuje to, iż szlaki często uważane za dwa odrębne wzajemnie się zazębiają i potęgują swoje działanie. Miejscem w komórce, gdzie fizycznie białka ścieżki zewnątrz- i wewnątrzpochodnej oddziałują ze sobą, są właśnie mitochondria [3,26].

MITOCHONDRIA SEKWESTRUJĄ BIAŁKA PROAPOPTOTYCZNE

Mitochondria regulują apoptozę na wiele sposobów. Jednym z nich jest akumulacja czynników apoptotycznych i ich uwolnienie, po otrzymaniu sygnału śmierci. Kilka proapoptotycznych białek, takich jak: cytochrom c, AIF, endonukleaza G, HtrA2/Omi,

Smac/DIABLO jest zlokalizowanych w przestrzeni międzybłonowej mitochondrium. Kiedy są z niej uwalniane, dochodzi do aktywacji kaskad sygnałowych inicjujących szlak apoptozy (kaspaza 8 i 9), a także neutralizacji cytoplazmatycznych inhibitorów kaspazy i pobudzenia nukleaz [2,16,18,25,27,28,29].

Spośród mitochondrialnych białek proapoptotycznych wiele uwagi poświęcono cytochromowi *c* (cyt *c*). Najlepiej poznana jest aktywacja kaspaz przez kompleks cyt *c* - Apaf-1 w obecności ATP. Cytochrom *c* w cytozolu oddziałuje z białkiem Apaf-1, co prowadzi do oligomeryzacji Apaf-1. Oligomery Apaf-1 wiążą się z prokaspazą 9 i powstaje apoptosom, czyli kompleks aktywujący prokaspazę 9. Kaspaza 9 aktywuje z kolei prokaspazę 3, uruchamiając kaskadę kaspaz odpowiedzialną za apoptozę. Po uwolnieniu cytochromu *c* są aktywowane kaspazy: -2, -3, -6, -7, -8, i -10 [18,30]. Z kolei AIF przemieszcza się do jądra, gdzie aktywuje kondensację i cięcie chromatyny przez towarzyszącą mu nukleazę EndoG. AIF przyczynia się także do rozbicia kompleksów Apaf-1 z Bcl-X_L i dzięki temu promuje tworzenie apoptosomu [1,29,31].

Kolejnymi białkami uwalnianymi z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów po indukcji apoptozy są Smac/DIABLO i HtrA2/Omi. Są to białka, które unieczynnają inhibitory kaspaz (IAP, ang. *inhibitory apoptotic proteins*). W zdrowej komórce białka IAP umożliwiają kontrolę przypadkowego przeciekania kaspaz, gdyż je dezaktywują i kierują do proteasomu [2,16,28,32].

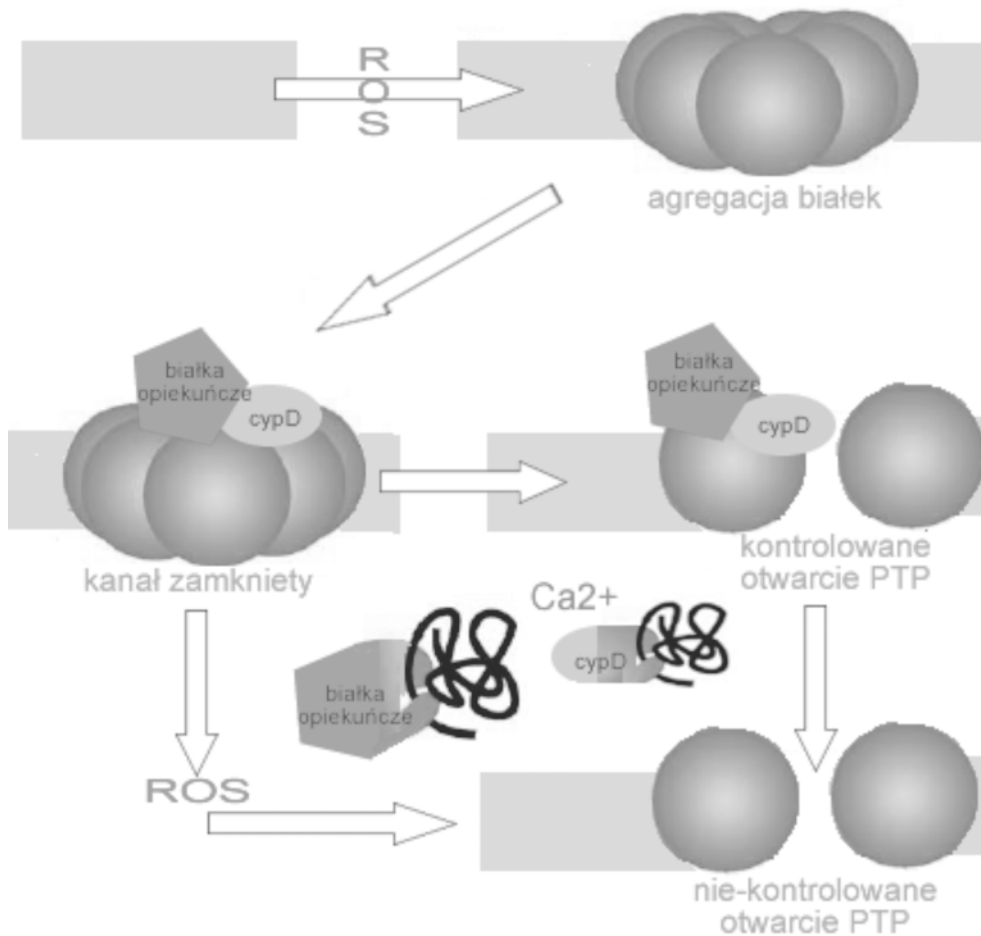
Ponadto z uwolnieniem cytochromu *c* jest często związane rozprężenie fosforylacji oksydacyjnej i spadek potencjału błonowego ($\Delta\Psi_{mt}$), którego regulacja należy także do białek Bcl-2. Eksperymentalnie pokazano, iż niska wartość $\Delta\Psi_{mt}$ jest jednym z głównych czynników decydujących o podatności komórek na apoptozę, a komórki nowotworów często charakteryzuje znacznie wyższy $\Delta\Psi_{mt}$ [16,25,27].

Należy pamiętać, iż dla genów wymienionych białek oddziałujących z mitochondriami wykazano liczne mutacje i zmiany ekspresji w komórkach nowotworowych. Przykładowo Apaf-1 często ma zmniejszoną ekspresję w czerniakach, a w wypadku kaspazy 8 odnotowano utratę funkcji w nerwiakach niedojrzałych. Bcl-2 z kolei jest częstokroć wyrażany na zbyt wysokim poziomie w chłoniaku grudkowym (chorobie Brillla i Symmersa), podczas gdy gen białka Bax jest zmutowany w gruczolakorakach przewodu pokarmowego, ostrej białaczce limfatycznej, chłoniaku Burkitta i nowotworze trzonu macicy, a z kolei mutacje genu białka Bad opisano w nowotworach prostaty, mózgu i czerniakach [16,31,32,33].

MITOCHONDRIA DECYDUJĄ O KOMÓRKOWEJ PULI WAPNIA

Kolejnym czynnikiem związanym z mitochondriami, a regulującym proces apoptozy są jony wapnia. Ca²⁺ jest kluczowym regulatorem życia komórki. W odpowiedzi na czynniki patologiczne następują zmiany stężenia Ca²⁺ w różnych kompartmentach komórki, co może indukować apoptozę. Przedłużone zmiany w stężeniu Ca²⁺ w cytoplazmie, mitochondrium i jądrze wywołują kaskadę zdarzeń prowadzących do

śmierci komórki. Po zadziałaniu bodźca uwolnione z ER Ca^{2+} wiąże się z wieloma czynnikami, m.in. z kalpainą, lub kalcyneuryną. Kalpaina to proteaza cysteinowa, która aktywuje Bax i Bid, co z kolei promuje ich przejście do mitochondrium. Efektem tej translokacji białek Bax i Bid jest uwolnienie cytochromu *c* z mitochondrium. Również nadmiar Ca^{2+} w mitochondrium stymuluje uwolnienie białek zlokalizowanych w przestrzeni międzybłonowej: cyt *c*, Smac/Diablo, Omi/HtrA2, pro-kaspaz. Aby skomplikować sprawę, dynamika rozmieszczenia Ca^{2+} w organellach jest regulowana m.in. przez opisane wcześniej białka z rodziny Bcl-2 [3,5,15,34].

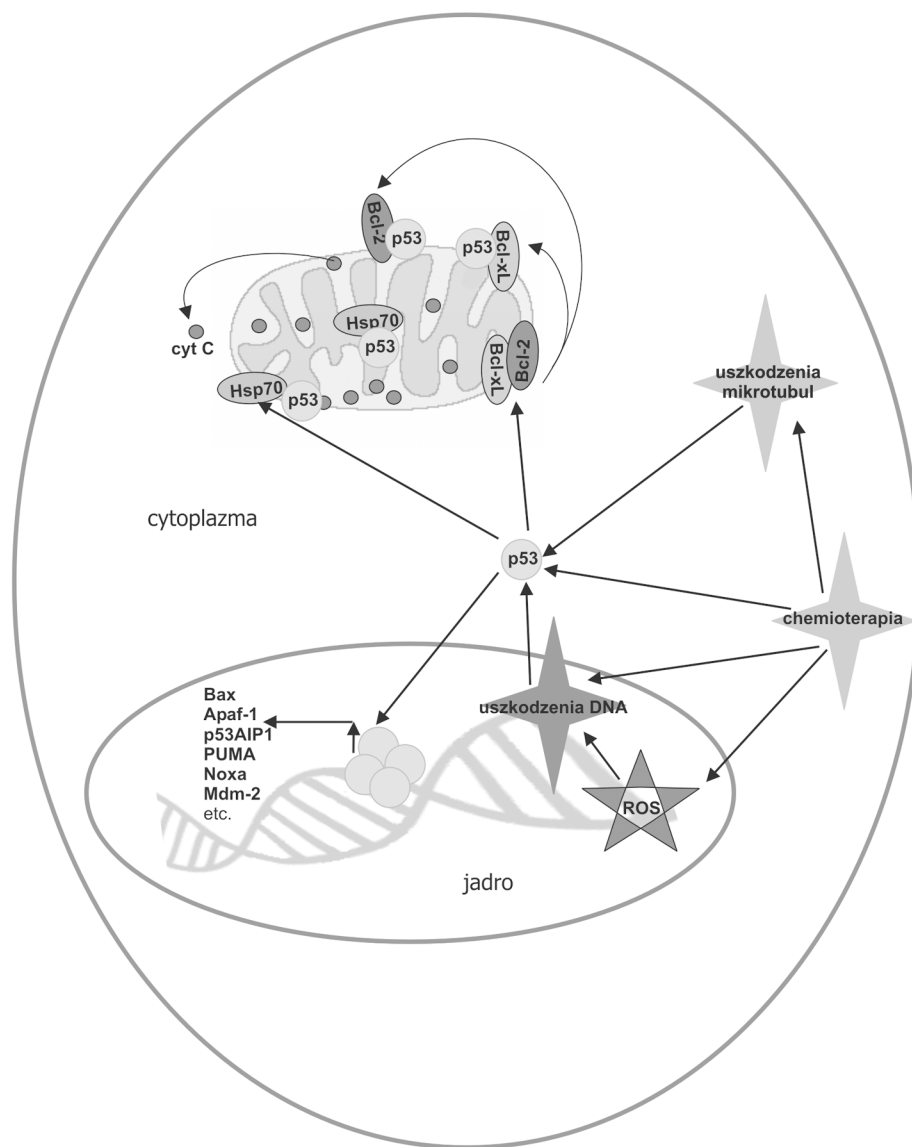


RYCINA 3. Rola jonów wapnia i cyklofilina D w apoptozie. W zależności od wapnia apoptozie podstawowa rola przypada PTP (ang. *permeability transition pore*). ROS uszkodzają błonowe białka mitochondrialne. Jeśli ilość uszkodzeń jest niewielka, cyklofilina D zamyka pory tworząc kompleks ze źle sfałdowanymi białkami. Kiedy poziom Ca^{2+} w mitochondrium wzrasta na skutek nadmiernej aktywacji, cyklofilina D wiąże się wówczas z napływającymi jonami wapnia, a więc nie wiąże białek, a kanał się otwiera

Jedną z hipotez mówi, iż główną rolę w zależnej od wapnia apoptozie wywołanej przez mitochondria odgrywają PTP (ang. *permeability transition pore*) i ich podjednostka – cyklofilina D (patrz ryc. 3). ROS uszkodzają błonowe białka mitochondrialne. Białka te ulegają rozfałdowaniu, co powoduje ekspozycję hydrofilowych reszt aminokwasowych do błony lipidowej. W konsekwencji uszkodzone białka agregują powierzchniami hydrofilowymi i mogą tworzyć pory przepuszczające niewielkie cząsteczki, np. cyt *c*. Jeśli ilość uszkodzeń jest niewielka, mitochondrialne białka opiekuńcze regulują przepuszczalność powstałych porów. Jednym z biorących w tym udział białek opiekuńczych jest właśnie cyklofilina D – izomeraza prolylowa zlokalizowana od strony macierzy mitochondrialnej. W warunkach fizjologicznych kompleks cyklofiliny i białek źle sfałdowanych zamyka por. Tak jest tylko do czasu, dopóki poziom Ca^{2+} nie wzrośnie w mitochondrium na skutek nadmiernej aktywacji, jak np. po uszkodzeniu komórki przez patogen. Cyklofilina D wiąże się wówczas z napływającymi jonami wapnia, w związku z czym nie wiąże już białek i kanał się otwiera. Alternatywnie, niezależnie od ilości jonów wapnia w mitochondrium, białka błonowe są niszczone przez ROS. Kiedy liczba źle sfałdowanych białek w błonie przewyższy liczbę dostępnych białek opiekuńczych, pory otwierają się, tak jak ma to miejsce przy mutacjach białek OXPHOS. Wydaje się jednak, iż jony wapnia wpływają na mitochondria także w innych mechanizmach [15,34,35,36,37].

MITOCHONDRIA SĄ MIEJSCEM DZIAŁANIA p53

Dotychczas udało się opisać kilka wzajemnie ząbających się szlaków prowadzących do nieodwracalnej degradacji komórki [3]. Jeden z podstawowych szlaków apoptozy przebiega w sposób zależny od aktywności białka p53 [22,38]. p53-zależna ścieżka apoptozy polega na działaniu p53 jako czynnika transkrypcyjnego, ale także jego aktywności w funkcjach innych niż regulacja ekspresji genu na poziomie inicjacji transkrypcji. Procesy te nie są jednak dokładnie poznane [22,39]. Wiemy, iż apoptoza wywołana przez p53 obejmuje aktywację kompleksu Apaf-1-kaspazy-9 [22]. Udało się pokazać, iż część cytoplazmatycznego białka p53 na początku procesu apoptozy przemieszcza się do mitochondrium i jest tam akumulowana na jego powierzchni. Gromadzenie p53 w mitochondrium zachodzi w ciągu godziny od aktywacji p53 następującej po zadziałaniu czynników toksycznych [40]. Po transporcie p53 w okolice mitochondrium dochodzi do spadku $\Delta\Psi_m$, uwolnienia cyt *c* i aktywacji pro-kaspazy-3 [39]. W dalszym etapie odpowiedzi komórki dochodzi do zwiększenia ekspresji białka PUMA (w ciągu 2 godzin), NOXA (w 4 godziny) i Bax (w 8 godzin) [41]. Widać zatem, iż dla zajścia apoptozy, p53 działa zarówno w jądrze – wiążąc się z DNA (promotory genów) oraz jako białko cytoplazmatyczne łącząc się z błoną mitochondrialną (patrz ryc. 4) lub po przemieszczeniu do mitochondrium. W odpowiedzi na uszkodzenie komórki p53 przemieszczane jest do mitochondrium. Część p53 pozostaje związana z zewnętrzną błoną mitochondrialną, natomiast część jest przemieszczana do matriksu mitochondrium. Dotychczas udało się zlokalizować p53 w połączeniu z Hsp70 i Hsp60



RYCINA 4. Udział p53 w apoptozie. Białko p53 w czasie apoptozy pobudza uwalnianie cytochromu c z mitochondrium. p53, które lokalizuje się w błonie zewnętrznej mitochondrium, wiąże się z białkami z rodziny Bcl-2 tworząc kompleksy p53/BclX i p53/Bcl2. W matriks mitochondrialnej wiąże się z mtHsp70, co może prowadzić do utraty funkcji czynnika transkrypcyjnego. W jądrze p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym dla białek proapoptotycznych (Bax, Apaf-1, PUMA, Noxa)

należącymi do kompleksu transportującego białka poprzez błonę mitochondrium [42,43]. Ponadto w cytoplazmie, w wyniku proteolitycznego cięcia p53 przez kaspazy powstają cztery polipeptydy, z których dwa pozbawione są sygnału lokalizacji jądrowej i pozostają w cytoplazmie. Polipeptydy te przemieszczane są do mitochondrium, co prowadzi do

depolaryzacji i obniżenia potencjału mitochondrialnego [44]. W końcu przemieszczenie p53 do mitochondrium powoduje uwolnienie cytochromu *c* do cytoplazmy. Jednak szczegóły mechanizmu, w którym p53 wpływa na uwalnianie cyt *c* z mitochondrium, są wciąż nieznane [22]. p53, które lokalizuje się w błonie zewnętrznej mitochondrium, wiąże się z białkami z rodziny Bcl-2, które tworzą w błonie mitochondrium kanał umożliwiający wypływ cyt *c*. Dotychczas udało się zlokalizować kompleksy p53/BclX_L i p53/Bcl2 [40]. Wiązanie Bcl2 z p53, które następuje w odpowiedzi na uszkodzenia DNA, zachodzi dzięki rozrywaniu kompleksów Bcl2-Bax. Jest to możliwe, ponieważ p53 wiąże się z domeną FLD białka Bcl2 (ang. *flexible loop regulatory domain*, FLD). Białko p53 wpływa na wiązanie Bcl2 z Bax wiążąc się z regionem od 32 do 68 aminokwasu w regionie regulatorowym domeny FLD (ang. *negative regulatory region of the FLD*) [45].

Z kolei jako czynnik transkrypcyjny p53 podnosi ekspresję białek mitochondrialnych biorących udział w apoptozie. Należą do nich aktywator pro-kaspazy-9 – Apaf1, kilka białek pro-apoptotycznych rodziny Bcl-2 [23,24], a także inne białka proapoptotyczne: Bax, Bid, Asc, Apaf-1, Kaspaza-6, Fas [46,47,48], Noxa [49] i Puma [24]. Do repertuaru tego dołączają także białka receptorowe CD95 (Fas/APO-1) i Killer/DR5 oraz białko rozprzegające potencjał mitochondrialny – P53AIP1 [22,50]. Ostatnio wykazano również interakcje p53 z mitochondrialnym czynnikiem transkrypcyjnym A (mtTFA) [51] oraz polimerazą γ [52], które także wydają się mieć znaczenie dla homeostazy komórki i jej potencjalnego wejścia na ścieżkę apoptozy. p53 wiąże mtTFA, co 10–20-krotnie podwyższa jego wydajność w naprawianiu uszkodzenia mtDNA [51], a wiążąc mitochondrialną polimerazę DNA (Pol γ) wspomaga replikację [52]. Oba te oddziaływania zdają się zmniejszać ilość uszkodzeń mtDNA i co za tym idzie zmniejszają prawdopodobieństwo transformacji lub wejścia w apoptozę. Ponadto wykazano, iż p53 zlokalizowane w wewnętrznej błonie mitochondrium oddziałuje z białkami biorącymi udział w naprawie mtDNA przez wycinanie (ang. *mitochondrial base excision repair complex* – mtBER), co zwiększa ich aktywność [53].

MITOCHONDRIALNE BIAŁKO MORTALINA MOŻE PRZYCZYNIĆ SIĘ DO TRANSFORMACJI

Od dawna wskazywano na rolę białek opiekuńczych, w tym białek szoku cieplnego, w procesie nowotworzenia. W wielu liniach nowotworowych wykazano nadekspresję białek szoku cieplnego. Do białek tych należy mortalina (mtHsp70, Pbp74, p66mot, Grp75). Molekularne podstawy nadekspresji białek opiekuńczych w nowotworach nie są poznane. Pytanie o etiologię tego stanu pozostaje w dużej mierze bez odpowiedzi, a i przyczyna nadekspresji mortaliny pozostaje do ustalenia [54,55,56,57].

mtHsp70 ulega ekspresji konstytutywnej, ale może być dodatkowo nasiloną przez brak glukozy, jonofory, analogi aminokwasów, ozon, promieniowanie jonizacyjne, nadczynność tarczycy, niedokrwienie, ale nie przez szok cieplny. Mortalina jest ekspresjonowana w każdej z 60 analizowanych pod tym kątem tkanek zdrowych i nowotworowych. Cechą charakterystyczną jest inna lokalizacja mortaliny w zdrowych

komórkach, a inna w komórkach immortalizowanych lub nowotworowych. W obrębie całej cytoplazmy jest opisywana w zdrowych liniach komórkowych zwierzęcych i ludzkich, natomiast okołojądrowe rozmieszczenie zostało zaobserwowane w materiałach z biopsji guzów nowotworowych i w immortalizowanych *in vitro* komórkach. Przesunięcie mortaliny w obszar okołojądrowy obserwowano wraz z postępującym zezłośliwieniem guza, natomiast rewersję tej lokalizacji do rozmieszczenia w całej cytoplazmie, podczas gdy komórki traciły nieśmiertelny fenotyp. Ponadto w wielu liniach komórkowych oraz materiale z biopsji guzów nowotworowych wykazano wysoki poziom ekspresji mortaliny, co może razem sugerować udział mortaliny w transformacji nowotworowej [2,54,58,59,60,61].

Nadekspresja mortaliny daje także przewagę we wzroście, co pokazano na komórkach HL60 (białaczką), gdzie udowodniono, iż jest ona przyczyną blokady ich różnicowania. Nadekspresyjowana mortalina zapewnia wydłużony czas życia komórek i powoduje immortalizację, co pokazano na przykładzie komórek HFF5 (ang. *human foreskin fibroblasts*), w których mortalina ulegała wysokiej ekspresji [54,60,61,62].

cDNA mortaliny izolowane ze zdrowych, jak i immortalizowanych komórek ludzkich ma taką samą sekwencję, co wskazuje, iż za różną dystrybucję tego białka w komórkach ludzkich są odpowiedzialne modyfikacje potranslacyjne lub oddziaływania z innymi białkami. Dynamiczna lokalizacja mortaliny i jej przynależność do grupy białek szoku cieplnego pozwala na spekulacje co do jej funkcji i mechanizmu działania. Proponowana jest rola opiekuńcza dla białek mitochondrialnych oraz udział w homeostazie Ca^{2+} w mitochondriach. Ze względu na homologię do DnaK (Hsp70 *E. coli*) proponuje się, iż może ona być zaangażowana w replikację mtDNA, gdyż dla DnaK udowodniono rolę w replikacji DNA *E. coli* [63]. Wiadomo na pewno, że inaktywacja mtHsp70 u drożdży powoduje agregację mitochondriów. Wysłunęto więc hipotezę, że mtHsp70 jest konieczne dla optymalizacji funkcji niezidentyfikowanych jeszcze termo-labilnych białek mitochondrialnych [64].

Istotny wydaje się być fakt, iż mortalina oddziałuje w komórkach ludzkich transformowanych nowotworowo z niezmutowanym p53, choć białka te nie są wykrywane razem w zdrowych komórkach (patrz ryc. 4). Dodatkowo przykuwa uwagę fakt, iż mitochondria, w których zlokalizowano p53, są położone blisko jąder komórkowych. Kolokalizację p53 i mortaliny w rejonie okołojądrowym wykazano m.in. w komórkach: HeLa (rak szyjki macicy), A2182 (rak pęcherza), U2OS (kostniako-mięsak), A172 (glejak), NT-2 (potworniak złośliwy), SY-5Y i YKG-1 (nerwiak niedojrzały) czy MCF7 (rak piersi), natomiast jej brak w zdrowych mysich fibroblastach (linia CMEF), zdrowych ludzkich fibroblastach TIG-3 czy MRC-5. Wydaje się wysoce prawdopodobne, iż mortalina funkcjonuje analogicznie do swego cytoplazmatycznego homologa. W ludzkich komórkach Hsp70 może wiązać p53 w cytoplazmie i przyczyniać się do jego sekwestracji poza jądrem, co funkcjonalnie prowadzi do utraty funkcji supresora nowotworu, gdyż zapobiega translokacji p53 do jądra, jako że C-końcowa domena lokalizacji cytoplazmatycznej p53 (ang. *cytoplasmatic sequestration domain*) jest wiązany przez mot-2 (mysi homolog mortaliny) [54,65,66]. Efektem inaktywacji p53 przez mot-2 jest obniżenie transkrypcji genów zależnych od p53, jak p21^{WAF-1} i Mdm-2. W opisanym

mechanizmie mortalina może przyczyniać się do transformacji komórek. Warto pamiętać, iż wcześniej sekwestracja p53 w cytoplazmie została udowodniona m.in. w nowotworach piersi, nerwiaku niedojrzałym, raku jelita grubego, glejaku siatkówki – i możliwe jest, iż to właśnie oddziaływanie mot-p53 miało istotną rolę w transformacji nowotworowej tych komórek [54,57,59,60,61].

Dane wskazują też na to, iż mot-2 w pewnym stopniu jest dodatkowo odpowiedzialna za obniżenie stabilnego poziomu p53. Mot-2 miałaby być zaangażowana w represję transkrypcji mRNA dla p53 lub degradację białka p53. Ponadto ekspresja p53 w komórkach transfekowanych o dużej ekspresji mortaliny jest opóźniona, a p53 zlokalizowane jest przyjądrowo w stopniu wzrastającym proporcjonalnie do nasilenia ekspresji mortaliny. W testach aktywności wykazano natomiast rozfałdowanie i inaktywację p53 przez mortalinę. Wydaje się zatem, iż mortalina reguluje aktywność p53 na wielu poziomach ekspresji jego genu [58].

Poza opisanym działaniem na czynniki transkrypcyjne wykazano, iż mortalina wiąże także inne typy białek. Należy do nich m.in. MPD (ang. *mevalonate pyrophosphate decarboxylase*). MPD przenosi grupy prenylowe w modyfikacji białek koniecznej dla ich aktywności, m.in. dla p21^{Ras} (Ras). Z tego względu mortalina w sposób pośredni wpływa na poziom stabilnego Ras – kontrolując jego prenylację. Nadekspresja mot-2 jest przyczyną stabilizacji MPD, a co za tym idzie obniżonego poziomu Ras [61].

PODSUMOWANIE

Procesem, w którym nadliczbowe, stare, lub uszkodzone komórki są eliminowane z organizmu, jest apoptoza. Właściwy przebieg tego procesu to podstawowy element homeostazy tkanki, i a co za tym idzie całego organizmu. Mitochondria są organellami, w których następuje integracja sygnałów apoptotycznych z różnych szlaków. Mitochondria w apoptozie, niezależnie od tego, jaka stymulacja ją wywołuje, odgrywają podstawową rolę w koordynacji sygnałów autodegradacji komórki. Każdy z elementów regulacji apoptozy może ulec zaburzeniu promując niekontrolowane podziały i immortalizację komórki, a w efekcie na poziomie organizmu rozwój nowotworu [4,5,6].

Mitochondria to organella kluczowe w fizjologii i homeostazie komórki. W ich obrębie przebiega i krzyżuje się ze sobą wiele fundamentalnych szlaków metabolicznych. Produkty reakcji przebiegających w macierzy mitochondrialnej są częstokroć konieczne dla przeżycia i/lub podziałów komórki. Integralność łańcucha transportu elektronów i jego pochodna, jaką jest wydajność fosforylacji oksydacyjnej, decydują o stanie energetycznym komórki. Ten z kolei stanowi klucz do regulacji ekspresji genów w odpowiedzi na bieżące zapotrzebowanie komórki w kontekście zmian w jej środowisku, a więc tkance czy całym organizmie. Z drugiej strony to przecież odpowiednia ekspresja genów odpowiada za modulację przemian energetycznych. Oczywiście jest, iż procesy przebiegające w komórce stanowią nierozdzielalną całość, a niebuforowalne zmiany muszą prowadzić do rozerwania tej spójnej sieci zależności. Mitochondria to właśnie

organellum integrujące lwią część procesów podstawowych dla przeżycia komórki. Niosą one swój własny niewielki genom (u człowieka mtDNA koduje 13 polipeptydów) i aparat syntezy białek (tRNA, rybosomy). Mutacje w obrębie mtDNA – jeśli skutkują w biosyntezie nieprawidłowych peptydów łańcucha transportu elektronów lub zmienionych tRNA – mogą przyczyniać się do transformacji nowotworowej. Rozprzężanie fosforylacji oksydacyjnej, rozchwianie gospodarki żelazem, wzmożona produkcja ROS to mogą być wszystko następstwa nieprawidłowej sekwencji mtDNA. Kolejnym ogniwem, które może być zaburzone w czasie biogenezy mitochondriów, jest samo fałdowanie białek. Jeśli grupa białek opiekuńczych związanych z tym organellum jest niefunkcjonalna, to skutki mogą być równie poważne jak mutacje w samych podjednostkach łańcucha. Zaburzony transport białek z cytozolu do mitochondrium, ich akumulacja w macierzy lub nadmierna degradacja, a także integracja w nieodpowiedniej proporcji, to wszystko może stać się przyczyną utraty funkcji mitochondriów. W końcu mitochondria stanowią fizycznie miejsce integracji szlaków pro- i anty-apoptotycznych. Widać zatem, iż od uszkodzenia mitochondriów do transformacji nowotworowej już niedaleko, dlatego nie dziwi fakt, iż szeroko pojęta dysfunkcja mitochondriów jest jedną z najbardziej znaczących cech komórek nowotworowych. Zmiany w mitochondriach manifestują się na wielu poziomach, zarówno w ich stanie w komórce – homoplazmii *versus* heteroplazmii, ultrastrukturze – kształcie, wielkości, stanie metabolicznym – potencjale redoks, wydajności produkcji ATP, a także w ich biochemii – jako lokalizacja określonych białek (np. p53), czy statusie molekularnym – mutacje mtDNA. Aktualny stan wiedzy na temat rozwoju chorób nowotworowych jest wciąż głęboko niezadowolający. Głębsze poznanie i zrozumienie mechanizmów patogenezy chorób mitochondrialnych będzie konieczne dla ewentualnego rozwoju nowych terapii. Jako podstawę leczenia można by wykorzystać choćby odmienną biochemiczną komórek nowotworowych, polegającą na nadprodukcji wolnych rodników. Gdyby zablokować eliminację wolnych rodników i doprowadzić do ich akumulacji, mogłoby to spowodować letalne uszkodzenia komórek nowotworowych. Ingerencja w biogenezę mitochondriów i ich lokalizacji komórkowej może stanowić nowe narzędzie terapii nowotworów. Pojawiły się rozważania, iż gdyby udało się modulować ekspresję białek mtHsp70, mogłoby to pozwolić na naprawę funkcji komórek nowotworowych tam, gdzie wykazano jej zaburzenia. I choć aktualnie nie mamy możliwości modyfikowania postępów chorób mitochondrialnych, jednak wciąż rozwijane są nowe strategie, co daje nadzieje na przyszłość [2,3,6,11,28,54,67,68,-69,70,71].

PODZIĘKOWANIA

Autorzy dziękują Panu Prof. dr hab. n. med. Andrzejowi Bieńkiewiczowi (Katedra Onkologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi), Panu Dr Tomaszowi Krawczykowi (Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki, Zakład Patomorfologii Klinicznej), Panu Dr Jerzemu S. Czarneckiemu (Uniwersytet Łódzki) oraz Panu Przemysławowi Tomalskiemu (*Centre for Brain and Cognitive Development, School of Psychology, Birkbeck College, UK*) za cenne uwagi i wskazówki podczas opracowywania tekstu.

BIBLIOGRAFIA

- [1] KROEMER G. Mitochondrial control of apoptosis: An introduction. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **304**: 433–435.
- [2] PARCELLIER A, GURBUXANI S, SCHMITT E, SOLARY E, GARRIDO C. Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **304**: 505–512.
- [3] LEIST M, JAATTELA M. Four deaths and a funeral: From caspases to alternative mechanism. *Nature Reviews Molecular Biology* 2001; **2**: 1–10.
- [4] EKERT PG, VAUX DL. The mitochondrial death squad: Hardened killers or innocent bystanders? *Curr Opin Cell Biol* 2005; **17**: 626–630.
- [5] BEDNAREK J, KILIANSKA ZM. Mitochondrial intermembrane space proteins in apoptosis process. *Post Biochem* 2005; **51**: 447–458.
- [6] DON AS, HOGG PJ. Mitochondria as cancer drug targets. *Trends Mol Med* 2004; **10**: 372–378.
- [7] GYRD-HANSEN M, NYLANDSTED J, JAATTELA M. Heat shock protein 70 promotes cancer cell viability by safeguarding lysosomal integrity. *Cell Cycle* 2004; **3**: 1484–1485.
- [8] JAATTELA M, CANDE C, KROEMER G. Lysosomes and mitochondria in the commitment to apoptosis: A potential role for cathepsin d and aif. *Cell Death Differ* 2004; **11**: 135–136.
- [9] JAATTELA M. Multiple cell death pathways as regulators of tumour initiation and progression. *Oncogene* 2004; **23**: 2746–2756.
- [10] KOPACZEWSKI B, KOPACZEWSKA M, NOWAK S. Apoptosis-molecular basis in pathogenesis of selected chronic inflammatory and neoplastic diseases. *Pol Merkuriusz Lek* 2005; **18**: 329–331.
- [11] BERTRAM JS. The molecular biology of cancer. *Molecular Aspects of Medicine* 2001; **21**: 167–223.
- [12] ETHELL DW, BOSSY-WETZEL E, BREDESEN DE. Caspase 7 can cleave tumor necrosis factor receptor-i (p60) at a non-consensus motif, *in vitro*. *Biochim Biophys Acta* 2001; **1541**: 231–238.
- [13] CROW MT, MANI K, NAM Y-J, KITSIS RN. The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. *Circ Res* 2004; **95**: 957–970.
- [14] PAGLIARI LJ, KUWANA T, BONZON C, NEWMAYER DD, TU S, BEERE HM, GREEN DR. The multidomain proapoptotic molecules bax and bak are directly activated by heat. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 17975–17980.
- [15] HAJNOCZKY G, DAVIES E, MADESH M. Calcium signaling and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **304**: 445–454.
- [16] WANG X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 2001; **15**: 2922–2933.
- [17] BOUCHIER-HAYES L, LARTIGUE L, NEWMAYER DD. Mitochondria: Pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 2005; **115**: 2640–2647.
- [18] NALEPA G, ZUKOWSKA-SZCZECOWSKA E. Caspases and apoptosis: Die and let live. *Wiad Lek* 2002; **55**: 100–106.
- [19] KROEMER G, JAATTELA M. Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer* 2005; **5**: 886–897.
- [20] VON AHSEN O, NEWMAYER DD. Cell-free apoptosis in *Xenopus laevis* egg extracts. *Methods Enzymol* 2000; **322**: 183–198.
- [21] WATERHOUSE NJ, GOLDSTEIN JC, KLUCK RM, NEWMAYER DD, GREEN DR. The (holey) study of mitochondria in apoptosis. *Methods Cell Biol* 2001; **66**: 365–391.
- [22] BENCHIMOL S. P53-dependent pathways of apoptosis. *Cell Death Differ* 2001; **8**: 1049–1051.
- [23] CHIPUK JE, KUWANA T, BOUCHIER-HAYES L, DROIN NM, NEWMAYER DD, SCHULER M, GREEN DR. Direct activation of bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 2004; **303**: 1010–1014.
- [24] CHIPUK JE, BOUCHIER-HAYES L, KUWANA T, NEWMAYER DD, GREEN DR. Puma couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. *Science* 2005; **309**: 1732–1735.
- [25] RUPNIEWSKA Z, BOJARSKA-JUNAK A. Apoptosis: Mitochondrial membrane permeabilization and the role played by bcl-2 family proteins. *Post Hig Med Dosw (Online)* 2004; **58**: 538–547.
- [26] CHO SG, CHOI EJ. Apoptotic signaling pathways: Caspases and stress-activated protein kinases. *J Biochem Mol Biol* 2002; **35**: 24–27.
- [27] AUGENLICHT LH, HEERDT BG. Mitochondria: Integrators in tumorigenesis? *Nat Genet* 2001; **28**: 104–105.

- [28] CAREW JS, HUANG P. Mitochondrial defects in cancer. *Mol Cancer* 2002; **1**: 9.
- [29] SAELENS X, FESTJENS N, VANDE WALLE L, VAN GURP M, VAN LOO G, VANDENABEELE P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 2004; **23**: 2861–2874.
- [30] SLEE EA, HARTE MT, KLUCK RM, WOLF BB, CASIANO CA, NEWMYER DD, WANG HG, REED JC, NICHOLSON DW, ALNEMRI ES, GREEN DR, MARTIN SJ. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: Hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* 1999; **144**: 281–292.
- [31] GERHARD MC, SCHMID RM, HACKER G. Analysis of cytochrome c-dependent apoptosis apparatus in cells from human pancreatic carcinoma. *Br J Cancer* 2002; **86**: 893–898.
- [32] FERNANDEZ-CHECA JC. Redox regulation and signaling lipids in mitochondrial apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **304**: 471–479.
- [33] BIERNAT W. Podstawy genetyki molekularnej nowotworów. W: KORDEK R, JASSEM J, KRZAKOWASKI M, JEZIORSKI A [red.] Onkologia podręcznik dla studentów i lekarzy. Gdańsk: Medical Press 2003.
- [34] NEWMYER DD, FERGUSON-MILLER S. Mitochondria: Releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* 2003; **112**: 481–490.
- [35] KIM JS, HE L, LEMASTERS JJ. Mitochondrial permeability transition: A common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **304**: 463–470.
- [36] HALESTRAP AP. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: A pore way to die. *Biochem Soc Trans* 2006; **34**: 232–237.
- [37] DEBSKA G, KICINSKA A, SKALSKA J, BEREST V, SZEWCZYK A. Mitochondrial ion channels. *Post Hig Med Dosw* 2002; **56**: 315–321.
- [38] GODEFROY N, LEMAIRE C, RENAUD F, RINCHEVAL V, PEREZ S, PARVU-FERECATU I, MIGNOTTE B, VAYSSIERE JL. P53 can promote mitochondria- and caspase-independent apoptosis. *Cell Death Differ* 2004; **11**: 785–787.
- [39] MARCHENKO ND, ZAIKA A, MOLL UM. Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. *J Biol Chem* 2000; **275**: 16202–16212.
- [40] ERSTER S, MOLL UM. Stress-induced p53 runs a transcription-independent death program. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **331**: 843–850.
- [41] ERSTER S, MIHARA M, KIM RH, PETRENKO O, MOLL UM. *In vivo* mitochondrial p53 translocation triggers a rapid first wave of cell death in response to DNA damage that can precede p53 target gene activation. *Mol Cell Biol* 2004; **24**: 6728–6741.
- [42] MOLL UM, WOLFF S, SPEIDEL D, DEPPERT W. Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. *Curr Opin Cell Biol* 2005; **17**: 631–636.
- [43] PIEKNA-PRZYBYLSKA D, AUGUSTYNIAK H. Import of protein into mitochondria. *Post Biochem* 2002; **48**: 262–274.
- [44] SAYAN BS, SAYAN AE, KNIGHT RA, MELINO G, COHEN GM. P53 is cleaved by caspases generating fragments localizing to mitochondria 10.1074/jbc.M512467200. *J Biol Chem* 2006; **281**: 13566–13573.
- [45] DENG X, GAO F, FLAGG T, ANDERSON J, MAY WS. Bcl2's flexible loop domain regulates p53 binding and survival. *Mol Cell Biol* 2006; **26**: 4421–4434.
- [46] YU J, ZHANG L. The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **331**: 851–858.
- [47] ZAMZAMI N, KROEMER G. P53 in apoptosis control: An introduction. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **331**: 685–687.
- [48] FRIDMAN JS, LOWE SW. Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 2003; **22**: 9030–9040.
- [49] ODA E, OHKI R, MURASAWA H, NEMOTO J, SHIBUE T, YAMASHITA T, TOKINO T, TANIGUCHI T, TANAKA N. Noxa, a bh3-only member of the bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 2000; **288**: 1053–1058.
- [50] MICHALAK E, VILLUNGER A, ERLACHER M, STRASSER A. Death squads enlisted by the tumour suppressor p53. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **331**: 786–798.
- [51] YOSHIDA Y, IZUMI H, TORIGOE T, ISHIGUCHI H, ITOH H, KANG D, KOHNO K. P53 physically interacts with mitochondrial transcription factor a and differentially regulates binding to damaged DNA. *Cancer Res* 2003; **63**: 3729–3734.
- [52] ACHANTA G, SASAKI R, FENG L, CAREW JS, LU W, PELICANO H, KEATING MJ, HUANG P. Novel role of p53 in maintaining mitochondrial genetic stability through interaction with DNA pol gamma. *EMBO J* 2005; **24**: 3482–3492.

- [53] CHEN D, YU Z, ZHU Z, LOPEZ CD. The p53 pathway promotes efficient mitochondrial DNA base excision repair in colorectal cancer cells. *Cancer Res* 2006; **66**: 3485–3494.
- [54] WADHWA R, TAIRA K, KAUL SC. Moratlin: A potential candidate for biotechnology and biomedicine. *Histol Histopathol* 2002; **17**: 1173–1177.
- [55] MACARIO AJ. Heat-shock proteins and molecular chaperones: Implications for pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *Int J Clin Lab Res* 1995; **25**: 59–70.
- [56] XU J, XIAO HH, SARTORELLI AC. Attenuation of the induced differentiation of hl-60 leukemia cells by mitochondrial chaperone hsp70. *Oncol Res* 1999; **11**: 429–435.
- [57] ZYLICZ M, KING FW, WAWRZYNÓW A. Hsp70 interactions with p53 tumor suppressor protein. *EMBO J* 2001; **20**: 4634–4638.
- [58] TAURIN S, SEYRANTEPE V, ORLOV SN, TREMBLAY TL, THIBAUT P, BENNETT MR, HAMET P, PSHEZHETSKY AV. Proteome analysis and functional expression identify mortalin as an antiapoptotic gene induced by elevation of [na⁺]_i/[k⁺]_i ratio in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 2002; **91**: 915–922.
- [59] WADHWA R, TAIRA K, KAUL SC. An hsp70 family chaperone, mortalin/mthsp70/pbp74/grp75: What, when and where? *Cell Stress Chaperones* 2002; **7**: 309–316.
- [60] WADHWA R, YAGUCHI T, HASAN K, MITSUI Y, REDDEL RR, KAUL SC. Hsp70 family member, mot-2/mthsp70/grp75, binds to the cytoplasmic sequestration domain of the p53 protein. *Experimental Cell Research* 2002; **274**: 246–253.
- [61] WADHWA R, YAGAUCHI T, HASAN K, TAIRA K, KAUL SC. Mortalin - mpd (mevalonate pyrophosphate decarboxylase) interactions and their role in control of cellular proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **302**: 735–742.
- [62] KAUL SC, YAGUCHI T, TAIRA K, REDDEL RR, WADHWA R. Overexpressed mortalin (mot-2)/mthsp70/grp75 and htert cooperate to extend the *in vitro* lifespan of human fibroblasts. *Exp Cell Res* 2003; **286**: 96–101.
- [63] ZYLICZ M, WAWRZYNOW A. Insights into the function of hsp70 chaperones. *IUBMB Life* 2001; **51**: 283–287.
- [64] WADHWA R, TAKANO S, KAUR K, AIDA S, YAGUCHI T, KAUL Z, HIRANO T, TAIRA K, KAUL SC. Identification and characterization of molecular interactions between mortalin/mthsp70 and hsp60. *Biochem J* 2005; **391**: 185–190.
- [65] CUI CW, YANG SJ, LIU YP, LIU YF. Interaction between p53 and hsp70 in human hepatocellular carcinoma tissues. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 2003; **19**: 195–196.
- [66] KAUL SC, REDDEL RR, MITSUI Y, WADHWA R. An n-terminal region of mot-2 binds to p53 *in vitro*. *Neoplasia* 2001; **3**: 110–114.
- [67] CHINNERY PF, TURNBULL DM. Epidemiology and treatment of mitochondrial disorders. *Am J Med Genet (Semin. Med. Genet.)* 2001; **106**: 94–101.
- [68] POMARA G, CAPPELLO F. Re: Heat shock proteins: Their role in urological tumors – letters to the editor. *J Urol* 2003; **170**: 927–929.
- [69] BARTNIK E, LORENC A, MROCZEK K. Human mitochondria in health, disease, ageing and cancer. *J Appl Genet* 2001; **42**: 65–71.
- [70] RICHLY E, CHINNERY PF, LEISTER D. Evolutionary diversification of mitochondrial proteomes: Implications for human disease. *Trends Genet* 2003; **19**: 356–361.
- [71] PENTA JS, JOHNSON FM, WACHSMAN JT, COPELAND WC. Mitochondrial DNA in human malignancy. *Mutat Res* 2001; **488**: 119–133.

Redaktor prowadzący – Lilla Hryniewiecka

Otrzymano: 08.05.2006 r.
Przyjęto: 12.07.2006 r.
ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa
anna.czarnecka@gmail.com